

# 9  
PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

the Application of:

SIERRA et al.

Group Art Unit: 1632

Application No.: 10/003,462

Examiner: Unknown

Filed: December 6, 2001

Attorney Dkt. No.: 024518-00002

For: VACCINE COMPOSITIONS CONTAINING TRANSFORMING GROWTH  
FACTOR ALPHA. IT USE MALIGNANT DISEASES THERAPY

RECEIVED

APR 09 2002

CLAIM FOR PRIORITY

Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

TECH CENTER 1600/2900  
April 5, 2002

Sir:

The benefit of the filing dates of the following prior foreign application/s in the following foreign country is hereby requested for the above-identified patent application and the priority provided in 35 U.S.C. §119 is hereby claimed:

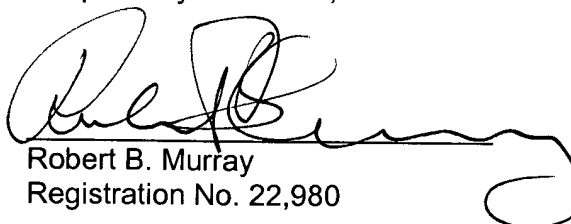
Cuban Patent Application No. **286/2000** filed on **December 6, 2000**

In support of this claim, certified copy(ies) of said original foreign application/s is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the requirements of 35 U.S.C. §119 have been fulfilled and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of these/this document.

Please charge any fee deficiency or credit any overpayment with respect to this paper to Deposit Account No. 01-2300.

Respectfully submitted,



Robert B. Murray  
Registration No. 22,980

Customer No. 004372  
ARENT FOX KINTNER PLOTKIN & KAHN, PLLC  
1050 Connecticut Avenue, N.W.,  
Suite 400  
Washington, D.C. 20036-5339  
Tel: (202) 857-6000  
Fax: (202) 638-4810  
RBM:sj



286/2000

REPÚBLICA DE CUBA

RECEIVED

APR 09 2002

TECH CENTER 1600/2900



Lic. Emilia Lara Díaz, Vice-Directora General de la  
OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

**CERTIFICO:** Que bajo el número doscientos ochenta y seis del año dos mil del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por **COMPOSICIÓN VACUNAL QUE CONTIENE FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE (TGFalfa). SU USO EN LA TERAPIA DE ENFERMEDADES MALIGNAS**, con fecha seis de diciembre de dos mil, a las diez horas y dos minutos pasado meridiano, por Josefa Lombardero Valladares, Representante, ciudadana cubana, a nombre y en representación de CENTRO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR, cuya invención fue creada por Aillette Mulet Sierra; Anabel Álvarez Acosta; Tamara Menéndez Medina; Gisela María González Marinello; Rolando Pérez Rodríguez; Gerardo Guillén Nieto y Belinda Sánchez Ramírez.

**ASIMISMO CERTIFICO:** Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

**TAMBIÉN CERTIFICO:** Que el Resumen, la Memoria Descriptiva, las Reivindicaciones y los Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Josefa Lombardero Valladares, Representante, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los tres días del mes de enero de dos mil dos.

Lic. Emilia Lara Díaz  
Vice-Directora General

RESUMEN



RECEIVED

APR 09 2002

TECH CENTER 1600/2900

**COMPOSICIÓN VACUNAL QUE CONTIENE FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE (TGF $\alpha$ ). SU USO EN LA TERAPIA DE ENFERMEDADES MALIGNAS.**

La presente invención está relacionada con el campo de la inmunología y la medicina humana, en particular con un preparado vacunal capaz de provocar una reacción de inmunocastración del TGF $\alpha$  autólogo.

El objeto de esta invención es la obtención de una composición vacunal para la inmunoterapia activa de tumores malignos dependientes del TGF $\alpha$  para su crecimiento. Así como para el tratamiento de otras enfermedades que dependan del TGF $\alpha$ .

Otro objeto importante de esta invención es la obtención de un preparado vacunal que incluya una combinación del TGF $\alpha$  con otros ligandos del EGF-R, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), capaz de inhibir la proliferación de tumores en cuya progresión dependen de estos factores de crecimiento. De esta manera se evitaría la resistencia que puede generar el tumor a vacunas que contenga cada uno de estas moléculas por separado, desarrollando variantes tumorigénicas que dependan del factor de crecimiento no utilizado en la vacunación.

Estos preparados vacúnales son capaces de inhibir la proliferación de tumores con las características antes mencionadas, y de este modo ser útil en el tratamiento de neoplasias malignas. Por lo tanto, la invención esta también relacionada con el campo de la inmunoterapia activa específica de cáncer.

Josefa Lombardero Valladares

Representante Legal

Centro de Inmunología Molecular

# **COMPOSICIÓN VACUNAL QUE CONTIENE FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE (TGF $\alpha$ ). SU USO EN LA TERAPIA DE ENFERMEDADES MALIGNAS.**

## **MEMORIA DESCRIPTIVA**

La presente invención está relacionada con el campo de la inmunología y la medicina humana, en particular con un preparado vacunal capaz de provocar una reacción de inmunocastración contra el TGF $\alpha$  autólogo, que pueda ser utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades neoplásicas y otras enfermedades relacionadas con el TGF $\alpha$ .

Por otra parte dicha invención incluye la utilización de un preparado vacunal constituido por una combinación de TGF $\alpha$  y EGF, para el tratamiento de neoplasias malignas que dependan de estos dos factores de crecimiento en el curso de su patogénesis.

El TGF $\alpha$  es un polipéptido de 50 aminoácidos, originalmente aislado del medio de cultivo de células transformadas por retrovirus. En un inicio se definió como una molécula capaz de competir con el EGF por la unión al EGF-R. Sin embargo, anticuerpos anti-EGF no eran capaces de reconocer al TGF $\alpha$  ( Todaro et al. (1976), Nature 264, 26-31), por lo desde entonces se conoce que ambos factores de crecimiento son dos entidades inmunológicamente diferentes.

El TGF $\alpha$  forma parte de la familia del EGF, que esta constituida por proteínas relacionadas estructural y funcionalmente. Los otros miembros de esta familia son: EGF, anfiregulina (AR), criptol (CR1), factor de crecimiento enlazador de heparina, betacelulina, epiregulina. Por otra parte la familia de los poxvirus incluye proteínas relacionadas con el EGF, dentro de ellas la más caracterizada es el factor de crecimiento de vaccinia virus (VGF).

Todas estas moléculas son capaces de unirse y activar al EGF-R, así que son conocidas como ligandos del mismo y juegan un rol en el crecimiento de células normales y neoplásicas en menor o mayor grado.

El EGF-R es una glicoproteína de 170 kD aproximadamente, cuyo gen ha sido clonado y secuenciado. El dominio intracelular de este receptor esta asociado con la actividad de proteínas tirosinas quinasas que muestran homología estructural con el producto del

oncogen v-erb-B, lo que muestra una relación con el proceso de transformación maligna (Heldin C.H. (1984), Cell 37, 9-20.)

El TGF $\alpha$  es sintetizado en forma de un precursor de membrana (pro-TGF $\alpha$ ), de 160 aminoácidos y mediante proteólisis enzimática se libera una proteína soluble de 150 aminoácidos aproximadamente, el TGF $\alpha$  maduro.

El TGF $\alpha$  humano (hTGF $\alpha$ ) muestra un 43% de identidad en la secuencia aminoácidica con el EGF humano (hEGF) y un 93% con el TGF $\alpha$  de ratón ó rata. Además sus efectos biológicos no son especie específicos.

El trabajo de muchos laboratorios ha documentado la habilidad del TGF $\alpha$  de regular la proliferación, migración y diferenciación de células en cultivo (Carpenter y Wahl. (1990), Springer-Verlag, Berlín, pp.69-171.)

El TGF $\alpha$  es el ligando del EGF-R más expresado. Se expresa en tejidos normales durante la embriogénesis y en tejidos adultos normales y tumorales. Sin embargo, no se observan defectos patológicos mayores en ratones TGF $\alpha$  "Knock-out" y estos ratones son viables y fértiles ( Bruce Mann y cols.(1993), Cell, 73, 249-261.).

En el proceso de tumorigénesis, la desregulación de los procesos paracrinos y autocrinos de activación del EGF-R, esta dada tanto por la sobreproducción de los factores de crecimiento como por la síntesis elevada y/o la mutación de sus receptores.

En tumores de origen epitelial se han detectado altos niveles de EGF-R y en muchos casos, la sobreexpresión de este receptor constituye un indicador de mal pronóstico.

La inducción de TGF $\alpha$  es un evento frecuente en la transformación neoplásica. De hecho, se han realizado numerosos estudios que muestran la sobreexpresión de esta molécula en tumores epiteliales de distintas localizaciones, que incluyen, mama, pulmón, cerebro, hígado, próstata, vejiga, tracto gastrointestinal, colon, recto, tejido reproductivo (ovario) y endocrino, entre otros.

Aunque el mecanismo de inducción de tumorigenicidad por el TGF $\alpha$  es aún desconocido, si existen algunos reportes que correlacionan la sobreexpresión de este factor de crecimiento con el grado del tumor, la sobrevida de pacientes y otros marcadores tumorales. Algunos investigadores han demostrado su relación con otros oncogenes como c-myc en hepatocarcinomas, además constituye un blanco del gen supresor de tumores (VHL)

(Sumarizado en Lee y cols. (1996), Growth Factors and Cytokines in Health and Disease, Volume 1B, 277-318.).

Aunque el TGF $\alpha$  y el EGF se unen al mismo receptor con afinidades comparables, generalmente el TGF $\alpha$  es más potente que el EGF, y en algunos contextos, sus efectos se han descrito como más fuertes y/o más prolongados ( Barrandon and Green (1987), Cell 50, 1131-1137). Se ha reportado que en el caso de la internalización del complejo TGF $\alpha$ /EGF-R, tanto el TGF $\alpha$  como el EGF-R son preferiblemente reciclados a la superficie mientras cuando el complejo EGF/EGF-R es internalizado en el mismo tipo celular, los dos componentes son eficientemente degradados (Ebner y Derynck (1991), Cell Regul.2,599-612), lo que sugiere que las diferencias en la actividad biológica puede estar dada por diferencias en los mecanismos que ocurren en el interior celular. Por otra parte el TGF $\alpha$  es un factor angiogénico más potente que el EGF (Schreiber y cols.(1986), Science 232, 1250-1253.)

En cuanto a la expresión en tumores, aun cuando hay evidencias de la presencia del precursor de EGF en membranas de algunos tumores epiteliales, el TGF $\alpha$  es expresado por una mayor cantidad de tumores del mismo origen, y se plantea que su acción, a diferencia del EGF, es principalmente mediante la formación de un lazo autocrino con el EGF-R. Por otra parte, resultados de nuestro centro indican que en biopsias de tumores epiteliales de algunos tipos se observa la presencia de TGF $\alpha$  y no EGF (carcinoma ductal de mama, laringe), mientras otros tumores presentan más EGF que TGF $\alpha$  (cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)). Estos resultados nos sugieren que los factores de crecimiento pueden tener impactos diferentes en la biología tumoral de la célula neoplásica blanco .

Todas las evidencias acumuladas en estos años acerca de la relación entre el sistema EGF-R/ EGF-R ligandos y el cáncer, convierten al mismo, en un blanco muy atractivo para la inmunoterapia de cáncer.

Resultados previos de nuestro grupo han demostrado la posibilidad de realizar una inmunoterapia activa de cáncer con la vacuna basada en EGF. De hecho, se han obtenido evidencias tanto preclínicas como clínicas acerca de la inmunogenicidad y la baja toxicidad provocada por la vacunación con hEGF unido a una proteína transportadora (González y cols.(1996), Vaccine Research 5(4), 233-243.)

Estudios preclínicos han mostrado que la inmunización de ratones con hEGF en adyuvante incrementa la sobrevida de ratones transplantados con el tumor ascítico de Erlich (TAE) (González y cols. (1996 ), Vaccine Research 5(4), 233-243.).

Se realizó una construcción genética de una proteína de fusión que contiene la secuencia del hEGF insertada entre el aminoácido 45/46 de la P64K. Esta proteína se usó como inmunógeno en ratones, provocando una respuesta inmune humoral específica contra el hEGF con impacto en el aumento de sobrevida de animales transplantados con células de TAE. (González y cols (1997), Vaccine Research 6(2), 91-100.)

En dos ensayos clínicos pilotos realizados con pacientes con NSCLC, se observó una tendencia en el aumento de la sobrevida de los pacientes vacunados cuando se comparan contra un control histórico. En los pacientes con alta respuesta sérica contra el hEGF se observó un marcado incremento en la sobrevida (González y cols.(1998), Annals of oncology 9, 1-5.).

En sentido general la vacunación con EGF no genera una respuesta de anticuerpos específicos contra el TGF $\alpha$ . Sin embargo tenemos evidencias que la vacunación con un preparado inmunogénico que contiene TGF $\alpha$  en el modelo murino genera un nivel de anticuerpos anti-EGF solamente en algunos ratones, dicha respuesta en algunos casos es capaz de bloquear la unión EGF a su receptor en un ensayo *in vitro*, sin embargo los niveles de anticuerpos anti-EGF obtenidos no son suficientes para generar una respuesta de inmunocastración del EGF con impacto en la respuesta antitumoral.

Debido a que la acción de cada uno de estos dos factores de crecimiento es diferente en cada tumor y/o entre el tumor primario y sus metástasis, una vacuna que combine los dos ligandos principales del EGF-R, TGF $\alpha$  y EGF, tendría un efecto antitumoral superior en los tumores de origen epitelial, en sentido general.

Hasta el momento de la presente invención, no se ha propuesto ninguna terapia que proponga la utilización de un preparado vacunal que contenga hTGF $\alpha$  o cualquier derivado , o una combinación del mismo con otro ligando del EGF-R, EGF, en la inmunoterapia activa de cáncer.

La presente invención provee una composición vacunal que contiene hTGF $\alpha$  o cualquier derivado de cualquier fuente, unido genéticamente (proteína de fusión recombinante) ó acoplado por métodos químicos a una proteína transportadora, capaz de inhibir el

crecimiento de tumores de origen epitelial, a través de un efecto de inmunocastración, sin efectos colaterales de importancia. También provee de una composición vacunal que contiene una combinación de hTGF $\alpha$  o cualquier derivado con hEGF o cualquier derivado unidos a una proteína transportadora.

La composición vacunal podrá ser utilizada en el tratamiento de tumores de origen epitelial dependientes de TGF $\alpha$  ó TGF $\alpha$ /EGF, o en cualquier otra enfermedad asociada con el TGF $\alpha$  tales como la psoriasis ( Kapp, A.(1993) J Dermatol Sci , Jun;5(3):133-42).

En la especificación de TGF $\alpha$ , se incluye cualquier fragmento y/o derivado del TGF $\alpha$  que tenga propiedades inmunológicas y/o efectos semejantes a la molécula original. Los derivados incluyen, pero no se excluyen otros, sustituciones originales de aminoácidos, cambio de aminoácidos sitio específico que incrementen la estabilidad y/o la actividad, modificaciones químicas, entre otras.



## COMPOSICIÓN VACUNAL QUE CONTIENE FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE (TGF $\alpha$ ). SU USO EN LA TERAPIA DE ENFERMEDADES MALIGNAS.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Más específicamente la invención consiste en un preparado vacunal capaz de provocar una reacción de inmunocastración contra el TGF $\alpha$  autólogo, que pueda ser utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades neoplásicas y otras enfermedades relacionadas con el TGF $\alpha$ .

Por otra parte dicha invención incluye la utilización de un preparado vacunal constituido por una combinación de TGF $\alpha$  y EGF, para el tratamiento de neoplasias malignas que dependan de estos dos factores de crecimiento en el curso de su patogénesis.

#### 1- Preparaciones inmunogénicas:

En la presente invención se utiliza un preparado vacunal que incluye hTGF $\alpha$  unido a una proteína transportadora por métodos de ingeniería genética (proteína de fusión recombinante) o por métodos químicos de conjugación. El hTGF $\alpha$  utilizado en cualquiera de las preparaciones inmunogénicas se obtiene tanto de fuente natural, recombinante ó sintética. Diferentes proteínas pueden ser utilizada como transportadoras. Como ejemplos de proteínas transportadoras se pueden utilizar: Toxoide Tetánico, KLH, la proteína P64K de *Neisseria meningitidis*, entre otras. Las cantidades óptimas de hTGF $\alpha$  en la formulación vacunal oscilan entre 5  $\mu$ g y 1000  $\mu$ g por dosis.

Por otra parte se utiliza un preparado vacunal que contiene una combinación del hTGF $\alpha$  con el hEGF (Oficina de Registro Nacional de Medicamentos, HEBERMIN No 1266).

En la especificación de TGF $\alpha$  ó EGF, se incluye cualquier fragmento y/o derivado del TGF $\alpha$  ó EGF que tenga propiedades inmunológicas y/o efectos semejantes a la molécula original. Los derivados incluyen, pero no se excluyen otros, sustituciones originales de aminoácidos, cambio de aminoácidos sitio específico que incrementen la estabilidad y/o la actividad, modificaciones químicas, entre otras.

**A) Obtención de la proteína de fusión TGF $\alpha$ -Proteína transportadora por métodos de ingeniería genética:**

El gen que codifica para el hTGF $\alpha$  (500 pb) se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos. El fragmento de ADN resultante es digerido y ligado en un sitio de unión específico a un vector de expresión en el cual se encuentra clonado el gen que codifica para la proteína transportadora, de manera que la proteína resultante incluye una copia o mas de las dos moléculas. Se puede utilizar cualquier vector de expresión tanto de células superiores (mamíferos) como inferiores (bacterias o levaduras). El vector también puede incluir seis histidinas en el extremo N-Terminal de la proteína transportadora. El plásmido resultante es verificado por análisis de restricción en geles de agarosa, análisis de la secuencia de ADN usando la enzima secuenciadora 2.0 (Amersham-USB), y finalmente, análisis de la producción de la proteína de fusión en cualquier cepa de expresión de *Escherichia coli*, mediante la técnica de "Western Blotting", usando un anticuerpo monoclonal específico contra hTGF $\alpha$  (R&D System). Para obtener la proteína se rompen las paredes bacterianas usando un método de ruptura fuerte y luego se purifica la proteína por una combinación de métodos de precipitación diferencial con sulfato de amonio y métodos cromatográficos. Finalmente, la proteína es filtrada en condiciones estériles y conservada a -20°C o liofilizada y conservada a 4°C hasta su uso posterior.

**B) Obtención de conjugados químicos que contiene hTGF $\alpha$ :**

Se obtienen diferentes preparaciones que contienen hTGF $\alpha$  conjugado con diferentes proteínas transportadoras (como P64K). En principio se puede utilizar cualquier método de acoplamiento químico. Como método químico preferencial se utiliza el método que utiliza el agente EMCS descrito en la patente norteamericana, U.S.Pat, No. 4,302,386; Lee y cols., 1981.

Alternativamente, se puede utilizar el método de conjugación con glutaraldehído. Con este fin, se mezclan estas dos ó tres moléculas a una concentración de 1 mg/mL en la solución final con glutaraldehído al 0.05% (en la solución total). La mezcla se incuba 1 hora a temperatura ambiente, y se dializa contra una solución de PBS 1X/MgCl<sub>2</sub> 10 mM, con tres cambios de la solución de diálisis. Finalmente, se realiza una diálisis contra PBS 1X por

toda la noche a 4°C. El preparado inmunogénico se filtra en condiciones estériles y se almacena a 4°C hasta su uso.

### **C) Obtención de una vacuna que combine el hTGF $\alpha$ y el hEGF.**

La obtención de una vacuna que combine los dos principales ligandos del EGF-R puede realizarse de diferentes maneras:

- 1- Unión de las dos vacunas que contienen el hTGF $\alpha$  o el hEGF por separado unido a una proteína transportadora en una relación 1:1 en el momento de la inyección. Con este fin se pueden utilizar las proteínas de fusión o los conjugados químicos de ambas moléculas. Las cantidades óptimas de hTGF $\alpha$  y hEGF en la formulación vacunal oscilan entre 5  $\mu$ g y 1000  $\mu$ g por dosis.
- 2- Obtención de una construcción genética similar a la descrita en la sección A que contenga los dos factores de crecimiento, hTGF $\alpha$  y hEGF o una combinación de cualquiera de sus derivados.
- 3- Obtención de un conjugado químico que contenga el hTGF $\alpha$ , hEGF o una combinación de cualquiera de sus derivados y una proteína transportadora utilizando la metodología descrita en la sección B.

### **D) Obtención de la preparación inmunogénica:**

Para potenciar el efecto inmunogénico deseado de las composiciones vacunales, es conveniente usar un adyuvante adecuado y seleccionar un modo de administración en el cual el preparado vacunal exhiba una alta inmunogenicidad.

Las composiciones vacunales referidas en esta invención son adyuvadas de dos maneras específicas

- 1) En Al(OH)<sub>3</sub> formando soluciones acuosas del preparado vacunal adsorbido a este compuesto. De 5  $\mu$ g a 1000  $\mu$ g de TGF $\alpha$  por dosis de inmunogéno se unen a un rango entre 2 y 5 mg de Al(OH)<sub>3</sub> y se deja en agitación por espacio de 1 hora. La solución final se conserva a 4°C hasta su uso posterior.
- 2) En adyuvante incompleto de Freund que permiten la formación de emulsiones acuosas/oleosas u oleosas/acuosas. Las cantidades de inmunogéno y adyuvante en la composición final se encuentran en un rango volumen/volumen de 40/60 a 60/40. Los

volumenes dependen de la emulsión final deseada. El adyuvante se añade antes de la inmunización y se agita por un periodo de 10 a 30 minutos, a temperatura ambiente.

Los volúmenes finales de cada inmunogéno cubren el rango adecuado para la ruta correspondiente.

En el caso de las vacunas que se conjugan en el momento de la inyección descritas en la sección C 1, las dos vacunas adyuvadas como se ha descrito anteriormente se pueden tanto unir por agitación e inyectar o inyectar por separado.

La administración de las composiciones vacunales se pueden realizar por diversas rutas: vía intramuscular, vía subcutánea, vía intranasal y vía intradérmica.

## EJEMPLOS

### **Ejemplo1: Obtención del segmento de ADN que codifica para TGF $\alpha$ maduro por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .**

A partir de un vector comercial pBluescript KS<sup>+</sup> que tiene clonado en un sitio ECOR V la cadena complementaria de ADN (ADNc) del hTGF $\alpha$  (PSK-TGF $\alpha$ ) (CIGB, Cuba) , se amplificó la secuencia de 150 aminoácidos correspondiente al TGF $\alpha$  maduro (Fig.1) usando los cebadores específicos para el hTGF $\alpha$  maduro:

*N-Terrminal: 5'- GCTCTAGAAGTGGTGTCCCATTTTAATGAC-3' (Subrayado , secuencia de corte de la enzima de restricción XbaI)*

*C-Terminal: 5'-CGGAATTCGCCAGGAGGTCCGCATGCTCAC-3' (Subrayado, secuencia de corte de la enzima de restricción EcoRI)*

Brevemente, Se utilizaron 200 ng del PSK TGF $\alpha$  en 75  $\mu$ L de una mezcla que contiene: 500ng de cada uno de los cebadores específicos, una mezcla de nucleótidos trifosfatos a una concentración de 200 $\mu$ M cada uno, MgCl<sub>2</sub> a 25 mM y 100 Unidades de la enzima TaqPolimerasa (Promega) en solución tampón suministrada por Promega. Se realizaron 30 ciclos de desnaturalización (1 minuto a 94°C), hibridación (1 minuto a 60°C), y extensión (30 segundos a 72°C). Al primer ciclo se antecedió un tiempo de desnaturalización de 4 minutos, y después del último ciclo, se llevo a cabo una extensión de 2 minutos.

El producto del PCR se separó por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión y el segmento génico amplificado se purifica según procedimientos convencionales de extracción con fenol y se somete a una digestión enzimática doble usando las enzimas Xba I y EcoR I (NEB, USA). De esta forma queda preparado el segmento génico que codifica para el TGF $\alpha$  maduro.

### **Ejemplo 2: Obtención del vector de expresión de la proteína fusionada TGF $\alpha$ -P64K .**

Se utilizó el vector de expresión pM 92 (CIGB, Cuba) que contiene el gen *lpdA* que codifica para la proteína de *Neisseria meningitidis* P64K (cepa B385) bajo el promotor del operón de triptofano de E.Coli (*trp*) y el terminador transcripcional de fago (*tT4*). El pM 92 confiere resistencia a los antibióticos ampicilina y kanamicina. Se transforma una cepa de E.Coli Dam<sup>-</sup> (GC-366) con el vector pM92 y se purificó el ADN plasmídico utilizando

un juego de reactivos comerciales (Quiagen) según las recomendaciones de los fabricantes. El vector PM 92 se digirió y se purificó a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión. Seguidamente se unió el vector PM92 con el ADNc correspondiente al hTGF $\alpha$  maduro anteriormente preparado, usando la enzima T4 ligasa (Gibco BRL). El plásmido resultante pMTGF codifica para la proteína de fusión que contiene el h-TGF $\alpha$  insertado entre el aminoácido 45/46 de la P64K. Este plásmido recombinante fue verificado por análisis de restricción en geles de agarosa, análisis de la secuencia de ADN secuenciado 2.0 (Amersham-USB), y finalmente, análisis de la expresión de la proteína de fusión en la cepa MM299 de E.Coli, mediante la técnica de "Western Blotting" usando un anticuerpo monoclonal específico contra h-TGF $\alpha$  (R&D System). La figura 2 muestra un esquema del proceso de obtención del vector de expresión pMTGF que codifica para la proteína de fusión TGF $\alpha$ -P64K.

**Ejemplo 3: Obtención del vector de expresión de la proteína fusionada TGF $\alpha$ -P64K con seis histidinas en el extremo N-Terminal (pMHisTGF $\alpha$ ).**

El vector de expresión pMHisTGF $\alpha$  se construyó siguiendo el mismo protocolo descrito en el ejemplo anterior utilizando como vector el PM224, que incluye un segmento codificante para seis histidinas en el extremo N-terminal de la P64K. La inclusión de un segmento que codifica para seis histidinas presenta ventajas en la purificación de la proteína por afinidad del mismo a quelatos metálicos.

**Ejemplo 4: Purificación de la proteína de fusión TGF $\alpha$ -P64K.**

Se cultivaron bacterias de E.Coli (cepa MM299) que expresan la proteína de fusión TGF $\alpha$ -P64K en medio de cultivo LBA (Tryptona 10 g/L, Extracto de Levadura 5g/L, NaCl 10 g/L y 50 mg/L de ampicilina) por 10 horas a 37°C. Después de la recolección de las células, todos los pasos fueron realizados de 0-4°C. La ruptura de la bacteria se realizó utilizando una prensa francesa a 1500 kg/cm<sup>2</sup>, y se removió la fracción insoluble mediante centrifugación a 11,000xg por 30 minutos. Como primer paso de purificación se llevó a cabo una precipitación al 40% de sulfato de amonio, que removió algunas de las proteínas contaminantes de E.Coli. El precipitado resultante fue removido mediante centrifugación a

11,000 xg, 4°C, por 30 minutos. El sobrenadante fue fraccionado mediante cromatografía de interacciones hidrofóbicas (TSK-butyl, Pharmacia, Sweeden), con un gradiente decreciente de sulfato de amonio del 40% al 0% en tampón Tris-Cl, pH= 7.2, que contiene 0.15M de cloruro de sodio. Seguidamente la muestra resultante se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en una columna G200 (Pharmacia ) equilibrada con PBS 1X, mostrando un nivel de pureza del 95%. La concentración de proteínas se determina usando el método de Lowry y cols ( (1951)J.Biol.Chem. 191, 495-498). La caracterización de la proteína fusionada se llevo a cabo mediante la técnica de "Western Blotting" , usando anticuerpos específicos contra P64K y TGF $\alpha$ .

#### **Ejemplo 5: Purificación de la proteína de fusión HisTGF $\alpha$ -P64K.**

Se cultivaron bacterias de E.Coli (cepa MM299) que expresan la proteína de fusión HisTGF $\alpha$ -P64K en medio de cultivo LBA (Tryptona 10 g/L, Extracto de Levadura 5g/L, NaCl 10 g/L y 50 mg/L de ampicilina) por 10 horas a 37°C. Después de la recolección de las células, todos los pasos fueron realizados de 0-4°C. La ruptura de la bacteria se realiza utilizando una prensa francesa a 1500 kg/cm<sup>2</sup>, y se remueve la fracción insoluble mediante centrifugación a 11,000xg por 30 minutos. Como primer paso de purificación se lleva a cabo una precipitación al 40% de sulfato de amonio, que remueve algunas de las proteínas contaminantes de E.Coli. El precipitado resultante fue removido mediante centrifugación a 11,000 xg, 4°C, por 30 minutos. El sobrenadante fue fraccionado mediante cromatografía de interacciones de afinidad por quelatos metálicos (Chelating Sepharose Fast Flow, Pharmacia, Sweeden), debido a la presencia de seis histidinas en la proteína, con un gradiente creciente de Imidazol de 25 mM a 500 mM en tampón Tris-Cl, pH= 5.5, que contiene 0.5 M de cloruro de sodio. Seguidamente la muestra resultante se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en una columna G25 (Pharmacia ) equilibrada con PBS 1X para eliminar las sales, mostrando un nivel de pureza del 95%. La concentración de proteínas se determinó usando el método de Lowry y cols ( (1951)J.Biol.Chem. 191, 495-498). La caracterización de la proteína fusionada se llevó a cabo mediante la técnica de "Western Blotting" , usando anticuerpos específicos contra P64K y TGF $\alpha$ .

**Ejemplo 6: Reconocimiento de la proteína recombinante TGF $\alpha$ -P64K por un anticuerpo monoclonal (AcM) específico por el hTGF $\alpha$ .**

Con el objetivo de determinar si el TGF $\alpha$  podía ser reconocido por un AcM anti-hTGF $\alpha$  comercial (Calbiochem) en el contexto de la proteína fusionada, realizamos la técnica de "Western Blotting". Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando 25  $\mu$ g de las proteínas EGF-P64K, TGF $\alpha$ -P64K ó P64K por duplicado y luego fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m según los procedimientos convencionales. Después de la transferencia las membranas se incubaron con una solución bloqueadora de TBS 1X mas 5% de leche descremada por toda la noche a 4 °C. Luego de un breve lavado con TBS 1X-Tween 20 (0.05%), las membranas se incubaron , una replica con un anticuerpo anti-P64K (1/ 500) (Fig.3A ) y la otra con un AcM anti-TGF $\alpha$  (1/100) (Fig.3B ) por dos horas a temperatura ambiente. Seguidamente se realizaron tres lavados con la misma solución y se incubaron las membranas con un antisuero anti-inmunoglobulinas totales de ratón 1/1000 conjugado con fosfatasa alcalina por una hora en iguales condiciones. Finalmente se le añadió 0.004 g de sustrato Fast Red ( Sigma) en tampón Tris-Cl 0.1 M pH=8.2 que contiene 0.004 g de Naphtol AS-MX Fosfato (Sigma) y 400  $\mu$ L de NN'Dimetil Formamida en 20 mL. La reacción se detuvo con lavados iguales a los descritos con anterioridad. Se observó un reconocimiento específico del AcM anti-hTGF $\alpha$  por la proteína TGF $\alpha$ -P64K (Fig. 3). Los resultados obtenidos demuestran que el TGF $\alpha$  en la proteína de fusión mantiene una estructura capaz de ser reconocida por un anticuerpo específico.

**Ejemplo 7: Obtención de un conjugado químico hTGF $\alpha$ -P64K.**

Se mezcló un mililitro de TGF $\alpha$  en PBS/MgCl<sub>2</sub> 10 mM a una concentración de 2 mg/mL con un mililitro de P64K a 2 mg/mL en el mismo solvente. Se añadió 0.2 mL de glutaraldeído al 0.5% para una concentración final de 0.05%. La mezcla se incubó 1 hora a temperatura ambiente, y se dializó contra una solución de PBS 1X/MgCl<sub>2</sub> 10 mM, con tres cambios de la solución de diálisis. Finalmente, se realizó una diálisis contra PBS 1X por toda la noche a 4°C. El preparado inmunogénico se filtró en condiciones estériles y se almacenó a 4°C hasta su uso.



**Ejemplo 8: Obtención de una proteína de fusión entre el hTGF $\alpha$ , hEGF y P64K.**

El gen que codifica para el hEGF (150 pb) se amplifica mediante PCR a partir del plasmido pBEF 10 que contiene al hEGF completo clonado en el sitio EcoR V del vector comercial pBluescript SK II (Stragene). El ADN obtenido de esta manera se une al vector pMHisTGF $\alpha$  en un sitio Bam HI que se encuentra en el final del extremo C-terminal de la P64K utilizando la metodología descrita en el ejemplo 2. De esta manera se obtiene el vector pMTGF $\alpha$ -EGF que codifica para la proteína de fusión TE-P64K

**Ejemplo 9: Obtención de un conjugado químico hTGF $\alpha$ -hEGF-P64K.**

Se mezcló un mililitro de hTGF $\alpha$  en PBS/MgCl<sub>2</sub> 10 mM a una concentración de 3 mg/mL con un mililitro de hEGF a 3 mg/mL y P64K a 3 mg/mL en el mismo solvente. Se añadió 0.6 mL de glutaraldeído al 0.5% para una concentración final de 0.05%. La mezcla se incubó 1 hora a temperatura ambiente, y se dializó contra una solución de PBS 1X/MgCl<sub>2</sub> 10 mM, con tres cambios de la solución de diálisis. Finalmente, se realizó una diálisis contra PBS 1X por toda la noche a 4°C. El preparado inmunogénico se filtró en condiciones estériles y se almacenó a 4°C hasta su uso.

**Ejemplo 10: Preparación de formulaciones que contienen hTGF $\alpha$ .**

Los diferentes preparados inmunogénicos descritos en los ejemplos 2, 3, 7, 8 y 9 se mezclaron con Al(OH)<sub>3</sub> ó Montanide ISA 51 según se describe en la descripción detallada de la invención. Se utilizaron cantidades que equivalen a 50  $\mu$ g de hTGF $\alpha$  en todos los preparados y 50  $\mu$ g de hTGF $\alpha$  y hEGF, en el caso de las vacunas combinadas descritas en los ejemplos 8 y 9. Se utilizó 2mg de Al(OH)<sub>3</sub> por cada preparado de proteína fusionada o conjugado químico de hTGF $\alpha$  ó hEGF que contiene 50  $\mu$ g equivalentes de cada factor de crecimiento respectivamente.

**Ejemplo 11: Preparación de una vacuna combinada que contiene la proteína TGF $\alpha$ /P64K y la proteína EGF/P64K.**

Se mezclaron 0.6 mg de cada una proteína, lo que equivale a 50  $\mu$ g de cada uno de los dos factores de crecimiento, en un volumen total de 0.5 mL y se unió con igual volumen de Montanide ISA 51 y se agitó 10 minutos a temperatura ambiente antes de la inyección.

En el caso de utilizar Al(OH)<sub>3</sub> como adyuvante, se mezclaron dos preparados vacunales que contienen 0.6 mg de proteína cada una de las proteínas antes mencionadas en 0.5 mL final adsorbidos en 2 mg de Al(OH)<sub>3</sub>.

**Ejemplo 12: Preparación de una vacuna combinada que contiene un conjugado químico TGF $\alpha$ /P64K y EGF/P64K.**

Se mezcló 0.25 mL de un preparado inmunogénico que contiene 50  $\mu$ g de TGF $\alpha$  unido a P64K según lo descrito en el ejemplo 7 con 0.25 mL de un preparado inmunogénico de iguales características que contiene hEGF y se mezcló con 0.5 mL de Montanide ISA 51 según lo descrito en el ejemplo 10, utilizando una jeringuilla, por un periodo de 10 minutos a temperatura ambiente.

En el caso de utilizar Al(OH)<sub>3</sub> como adyuvante, se mezclaron 0.5 mL de cada uno de los conjugados químicos antes descritos que contenían 50  $\mu$ g de hTGF $\alpha$  y hEGF respectivamente adsorbidos en 2 mg de Al(OH)<sub>3</sub>.

**Ejemplo 13: Inmunogenicidad de la TGF $\alpha$ -P64K / Adyuvante incompleto de Freund (Montanide ISA 51) en el modelo murino.**

Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad, ratones de la cepa Balb/c, hembras entre 6-8 semanas fueron inyectados por vía subcutánea con 58  $\mu$ g (5 $\mu$ g equivalentes de TGF $\alpha$ ), 116 $\mu$ g (10 $\mu$ g) ó 0,6 mg (50 $\mu$ g) de la TGF $\alpha$ -P64K en una proporción 1:1 con Montanide ISA 51. El inmunogéno se preparó según lo descrito en la descripción detallada de la invención agitándose por 10 minutos antes de la inmunización. Cada animal recibió 4 dosis quincenales. Se realizaron extracciones de sangre previo a la primera dosis, una semana después y cada dos semanas a partir de ese momento. El suero se separó de la sangre extraída de los animales y se determinó el título de anticuerpos específicos contra el hTGF mediante la técnica de ELISA indirecto.

Brevemente, las placas de ELISA (Costar) fueron recubiertas con 50µL/pozo de una solución de hTGFα a 2.5 µg/mL en tampón carbonato pH= 7.2 é incubadas toda la noche a 4°C. Después de tres lavados con PBS 1X-Tween 20 (0.05%), las placas se bloquearon con una solución de PBS 1X-Tween 20 (0.05%)-SFT (5%) por 1 hora a 37°C. Inmediatamente se añadieron los sueros de los ratones inmunizados, y se incubaron por 2 horas a 37°C. Luego de lavar las placas nuevamente, se incubaron con un anticuerpo de ratón anti-Inmunoglobulinas totales de ratón conjugado con fostasa alcalina (Sigma) diluído 1/1000 en PBS 1X-Tween 20 (0.05%)-SFT (5%) (50µL /pozo) por 1 hora a igual temperatura. Finalmente, luego de volver a lavar las placas de la misma manera, se añadió el sustrato de la enzima (p-nitrofenilfosfato(Sigma)) a una concentración de 1 mg/mL en tampón Dietanolamina pH=9.8 (50µL /pozo). La absorbancia del complejo enzima-sustrato formado se midió en un lector de ELISA a 405 nm.

En la figura 4 se observa la cinética de la respuesta polivalente de anticuerpos anti-hTGFα obtenida en ratones inmunizados con la TGFα-P64K.

Debido a la alta homología entre el hTGFα y el de rata ó ratón (93%) se puede considerar que la respuesta generada contra el hTGFα como una respuesta contra el TGFα autólogo.

#### **Ejemplo 14: Inmunogenicidad de la TGFα-P64K / Al(OH)<sub>3</sub> en el modelo murino.**

Se realizó un protocolo de inmunización según lo descrito en el ejemplo anterior, utilizando 2 mg Al(OH)<sub>3</sub> como adyuvante. El inmunógeno se preparó según lo descrito en la descripción detallada de la invención. Se obtuvieron títulos de anticuerpos específicos por TGFα de hasta 1/10000. La técnica utilizada para determinar el título de anticuerpos anti-TGFα fue la de ELISA indirecto descrita en el ejemplo 13.

#### **Ejemplo 15: Distribución de las subclases de inmunoglobulinas de isotipo IgG en los ratones inmunizados con la proteína TGFα-P64K / Adyuvante incompleto de Freund (Montanide ISA 51) en el modelo murino.**

Se determinó la distribución de subclases IgG obtenida mediante la técnica de ELISA indirecto descrita en el ejemplo 13, utilizando antisueros específicos contra la diferentes

subclases de IgG murino conjugados con biotina (Jackson) a una dilución de 1/1000 y posteriormente el complejo streptavidina-fosfatasa (1/1000).

Se determinó la proporción de cada una de las subclases de IgG con respecto a la IgG total en el suero de los animales inmunizados con 50 µg de TGFα en la proteína fusionada usando la vía subcutánea (Grupo 1) o intramuscular (Grupo 2) siguiendo el protocolo de inmunización descrito en el ejemplo 13. En la figura 5 se observa la distribución de subclases obtenida. Se obtuvo una mayor proporción de IgG1 en los dos grupos de ratones utilizados en el estudio.

**Ejemplo 16: Determinación de la capacidad de los sueros de los animales inmunizados con la proteína TGFα-P64K / Adyuvante incompleto de Freund (Montanide ISA 51) de inhibir la unión del TGFα-I<sup>125</sup> mediante la técnica de "radio receptor assay"(RRA).**

Con el objetivo de determinar si los anticuerpos generados en los protocolos de inmunización descritos anteriormente eran capaces de inhibir la unión del TGFα a su receptor, se realizó un ensayo *in vitro* denominado RRA. En síntesis, los sueros de los ratones inmunizados según se describe en el ejemplo 13 se incubaron con una mezcla que incluye 100 µL de membrana de placenta humana y 20 µL de TGFα-I<sup>125</sup> ( 100000 cpm) y 330 µL de tampón Tris-Cl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y BSA al 1%, pH=7.4. El marcaje de TGFα se realizó mediante el método de la cloramina T (Hunter y Greenwood (1962, Nature, 358:495-498). La mezcla se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y luego se detuvo la reacción con 1 mL del tampón antes mencionados. Finalmente se centrifugaron los tubos a 1000 rpm por 30 minutos. Las células sedimentadas se lavaron y dejaron secar. La radioactividad se midió en un contador gamma (Wallac, Finlandia). La caída en los valores de radioactividad medidos indica la inhibición del enlace entre el TGFα y su receptor, debida a la acción de los sueros ensayados. Se obtuvo un porcentaje de inhibición entre un 50%-80% en todos los sueros ensayados.

**Ejemplo 17: Determinación de la respuesta sérica contra el EGF humano (hEGF) generada por la inmunización con la proteína TGFα-P64K.**

Se determinó la presencia de anticuerpos anti-EGF en los sueros de los ratones que mostraron altos títulos de anticuerpos anti-TGFα, mediante la técnica de ELISA indirecto

previamente descrita. Diluciones de 1/100, 1/1000 y 1/10000 de los sueros se enfrentaron a placas recubiertas con hEGF (CIGB). En la figura 6 se muestran los títulos anti-EGF que mostraron los sueros de los animales inmunizados con la proteína TGF $\alpha$ -P64K, como se observa se obtiene respuesta de anticuerpos anti-EGF solamente en un grupo de ratones inmunizados.

Sin embargo ratones inmunizados con el conjugado químico EGF-P64K no mostraron ningún nivel de respuesta de anticuerpos anti-TGF $\alpha$ .

**Ejemplo 18: Reconocimiento de tumores humanos *in vitro* por un antisuero policlonal anti-hTGF $\alpha$  obtenido por la inmunización con la proteína TGF $\alpha$ -P64K / Adyuvante incompleto de Freund (Montanide ISA 51).**

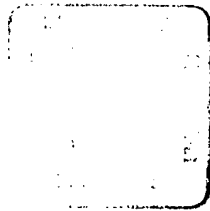
Se utilizó los antisueros policlonales anti-hTGF $\alpha$  obtenidos a partir de la inmunización de ratones con la proteína heteróloga TGF $\alpha$ -P64K en Montanide ISA 51 para determinar la expresión de TGF $\alpha$  en biopsias de tumores incluidas en parafina de pacientes vacunados con la vacuna basaba en EGF. En un paciente con alta respuesta de anticuerpos anti-hEGF, se observó una regresión del tumor NSCLC. Sin embargo, después se le detectó un segundo tumor de laringe. Biopsias de estos dos tumores fueron analizadas y se observó una expresión diferencial del EGF y el TGF $\alpha$  en cada una de ellas. En la figura 7 se muestran los valores de reactividad obtenidos con los diferentes monoclonales utilizados. Estos resultados confirman que mediante la inmunización con el preparado vacunal TGF $\alpha$ -P64K se generan anticuerpos específicos contra el hTGF $\alpha$  capaces de reconocer a esta molécula en tumores humanos.

**Ejemplo 19: Expresión de EGF (ARNm), TGF $\alpha$  (ARNm) y EGF-R (ARNm) en biopsias de carcinomas de mama**

Se extrajo el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de biopsias de tumores de mama utilizando el reactivo TRIZOL (Life technologies) y se convirtió ADNc mediante la enzima reverso transcriptasa. El ADNc total se sometió a 30 ciclos de PCR utilizando cebadores específicos para cada una de estas moléculas. Como control interno se utilizó un gen de mantenimiento celular presente en todas las células (GAPDH). El producto de PCR

obtenido se separó mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y se vizualizó con bromuro de etidio.

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos al utilizar los cebadores específicos para el EGF, TGF $\alpha$  , EGF-R y GAPDH (Control interno) en 22 carcinomas de mama. Solamente se observó EGF ARNm en 1/22 biopsias , sin embargo se observó una alta expresión de TGF $\alpha$  y EGF-R en la mayoría de las muestras. La correlación entre estas dos moléculas, sugiere la importancia del lazo autocrino TGF $\alpha$ / EGF-R en el crecimiento de este tipo de tumores (Figura 9).



---

Josefa Lombardero Valladares  
Representante Legal  
Centro de Inmunología Molecular

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1:** Secuencia genética y aminoacídica (letras subrayadas en negrita) del h-TGF $\alpha$  maduro.

**Figura 2:** Representación esquemática del proceso de obtención del vector de expresión pMTGF $\alpha$ .

**Figura 3:** Reconocimiento de la proteína de fusión TGF $\alpha$ -P64K por anticuerpos monoclonales anti-P64K (A) y anti-hTGF $\alpha$  (B) mediante la técnica de "Western Blotting". Se realizó una SDS-PAGE al 10 % de la P64K (1), EGF-P64K (2) y TGF $\alpha$ -P64K (3) y luego se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa donde se incubaron con anticuerpos específicos contra P64K (A) ó TGF $\alpha$  (B) con el objetivo de caracterizar la proteína fusionada entre el TGF $\alpha$  y la P64K.

**Figura 4:** Cinética de la respuesta de anticuerpos anti-hTGF $\alpha$ : Los títulos de anticuerpos específicos contra el hTGF $\alpha$  fueron medidos mediante la técnica de ELISA indirecto. Los ratones fueron inmunizados con 5  $\mu$ g (A), 10  $\mu$ g (B) y 50  $\mu$ g (C) de TGF $\alpha$ -equivalente en la proteína TGF $\alpha$ -P64K en Montanide ISA 51. Las abscisas representan los días en que se obtuvieron las muestras de suero de cada ratón individual y las ordenadas el recíproco de los títulos de anticuerpos alcanzados. Los día de inmunización se señalan con flechas en el gráfico A (Día 0, 14, 28 y 42).

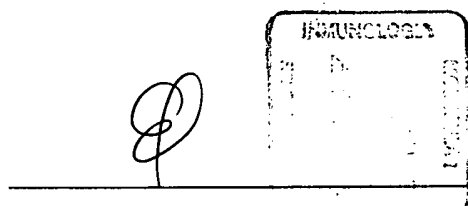
**Figura 5:** Distribución de subclases de los anticuerpos inducidos a partir de la inmunización con 50  $\mu$ g de TGF $\alpha$ -equivalente en la proteína fusionada. Comparación de la proporción de subclases de IgG en la respuesta de anticuerpos inducida con la inmunización de la proteína TGF $\alpha$ -P64K por vía subcutánea (1) ó intramuscular (2). Los valores de desviación estándar se muestran en la figura para cada uno de los grupos de 5 animales inmunizados.

**Figura 6:** Respuesta de anticuerpos específicos por el hEGF en ratones inmunizados con la proteína de fusión TGF $\alpha$ -P64K. En la tabla se muestran los valores del título de anticuerpos anti-TGF $\alpha$  y anti-EGF en ratones inmunizados con TGF $\alpha$ -P64K.

**Figura 7:** Determinación por métodos inmunohistoquímicos de la presencia de EGF-R, EGF y TGF $\alpha$  en biopsias de tumores de un paciente vacunado incluido en el ensayo clínico piloto II de vacuna EGF. La reactividad diferencial de estas tres moléculas en el tumor primario de pulmón y de un segundo tumor primario de laringe que apareció con posterioridad, se muestran con signos positivos en la figura.

**Figura 8:** Expresión de ARNm de EGF, TGF $\alpha$  y EGF-R en 22 carcinomas de mama. En la figura se muestran los productos de 30 ciclos PCR obtenidos con los cebadores específicos para cada molécula y visualizados con bromuro de etidio después de ser separados en geles de agarosa al 1.5%. También se observa la expresión de ARNm de GAPDH utilizado como control interno.

**Figura 9:** Correlación entre los niveles de TGF $\alpha$  ARNm y EGF-R ARNm en biopsias de carcinoma de mama: La intensidad de las bandas obtenidas con bromuro de etidio se analizó mediante un programa de computación (ImagQuant, Amersham) . El eje de las x muestran los valores de intensidad para los productos de PCR utilizando cebadores específicos para EGF-R entre los obtenidos con GAPDH, para cada una de las muestras y el eje de las y muestra los mismo pero para el TGF $\alpha$ . Se observó una correlación positiva entre la expresión de las dos moléculas,  $R^2 = 0.657$ ,  $p = 0.00121$ .



Josefa Lombardero Valladares

Representante Legal

Centro de Inmunología Molecular



## REIVINDICACIONES

### COMPOSICIÓN VACUNAL QUE CONTIENE FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE (TGF $\alpha$ ). SU USO EN LA TERAPIA DE ENFERMEDADES MALIGNAS.

- 1- Composición vacunal que contiene TGF $\alpha$  autólogo ó cualquier derivado del mismo ó su combinación con otros ligandos del EGF-R, enlazados a cualquier proteína transportadora, tanto por conjugación química como genéticamente, que contiene un adyuvante, capaz de producir una respuesta inmune específica contra el TGF $\alpha$  autólogo.
- 2- Composición vacunal según reivindicación 1, que contiene TGF $\alpha$  humano recombinante .
- 3- Composición vacunal según reivindicación 1, que contiene P64K como proteína transportadora.
- 4- Composición vacunal según reivindicación 1, que contiene una proteína de fusión recombinante entre el TGF $\alpha$  y la P64K clonada en cualquier vector de expresión tanto de células superiores como inferiores y expresada en bacterias, levaduras o células superiores.
- 5- Composición vacunal según reivindicación 1, que contiene una proteína de fusión recombinante entre el TGF $\alpha$  y la P64K clonada en un vector de expresión de células inferiores y expresada en *E.coli*.
- 6- Composición vacunal según reivindicación 1, que contiene una proteína de fusión recombinante entre el TGF $\alpha$  y la P64K clonada en un vector de expresión de células inferiores que presenta una secuencia genética codificante para seis histidinas en el extremo N-terminal de la P64K y expresada en *E.coli* .
- 7- Composición vacunal según reivindicación 1, que contiene un conjugado químico entre hTGF $\alpha$  y P64K.
- 8- Composición vacunal según reivindicación 1, que contiene hTGF $\alpha$ , hEGF y P64K unidos por un método químico.

- 9- Composición vacunal según reivindicación 1, que contiene hTGF $\alpha$ , hEGF y P64K en una proteína de fusión recombinante clonada en un vector de células inferiores y expresada en *E.coli*.
- 10- Composición vacunal que represente la unión en el momento de la inyección de dos preparados vacunales que contengan conjugados químicos de la P64K con TGF $\alpha$  y el EGF respectivamente.
- 11- Composición vacunal que represente la unión en el momento de la inyección de dos preparados vacunales que contengan proteínas de fusión recombinantes entre la P64K y el TGF $\alpha$  o el EGF respectivamente.
- 12- Composición vacunal según reivindicación 1, que contiene Adyuvante incompleto de Freund como adyuvante.
- 13- Composición vacunal según reivindicación 1, que contiene Al(OH)<sub>3</sub> como adyuvante.
- 14- Método de inmunización con una composición vacunal según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 13, capaz de lograr anticuerpos específicos contra el hTGF $\alpha$ .
- 15- Método de tratamiento según reivindicación 14, capaz de generar anticuerpos anti-hTGF $\alpha$ , capaces de inhibir la unión del TGF $\alpha$  a su receptor en un ensayo *in vitro*.
- 16- Método de tratamiento según reivindicación 14, capaz de generar anticuerpos anti-hEGF.
- 17- Método de tratamiento según reivindicación 14, capaz de generar anticuerpos anti-hTGF $\alpha$ , capaces de reconocer al TGF $\alpha$  en biopsias de tumores humanos.
- 18- Método de tratamiento de enfermedades malignas, tales como carcinomas epidermoides de mama, próstata, gástrico, cáncer epiteliales de ovario que expresen TGF $\alpha$  y otros ligandos del EGF-R, tales como el EGF, con una composición vacunal según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 13.



Josefa Lombardero Valladares

Representante Legal

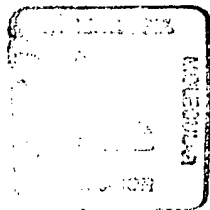
Centro de Inmunología Molecular



Figura 1

<u>1-V</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>H<sup>+</sup></u>	<u>F</u>	<u>N</u>	<u>D<sup>-</sup></u>	<u>C<sub>8</sub></u>	<u>P<sub>9</sub></u>	<u>D<sup>-</sup></u>	<u>S</u>	<u>H<sup>+</sup></u>	<u>T</u>	<u>Q</u>	<u>F</u>
GTG-GTG-TCC-CAT-TTT-AAT-GAC-TGC-CCA-GAT-TCC-CAC-ACT-CAG-TTC-														
<u>C<sub>16</sub></u>	<u>F</u>	<u>H<sup>+</sup></u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>C<sub>21</sub></u>	<u>R<sup>+</sup></u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>Q</u>	<u>E<sup>-</sup></u>	<u>D<sup>-</sup></u>	<u>K<sup>+</sup></u>	<u>P<sub>30</sub></u>
TGC-TTC-CAT-GGA-ACC-TGC-AGG-TTT-TTG-GTG-CAG-GAG-GAC-AAG-CCA-														
<u>A</u>	<u>C<sub>32</sub></u>	<u>V</u>	<u>C<sub>34</sub></u>	<u>H<sup>+</sup></u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>R<sup>+</sup></u>	<u>C<sub>43</sub></u>	<u>E<sup>-</sup></u>	<u>H<sup>+</sup></u>
GCA-TGT-GTC-TGC-CAT-TCT-GGG-TAC-GTT-GGT-GCA-CGC-TGT-GAG-CAT-														
<u>A</u>	<u>D<sup>-</sup></u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>-50</u>									
GCG-GAC-CTC-CTG-GCC.														



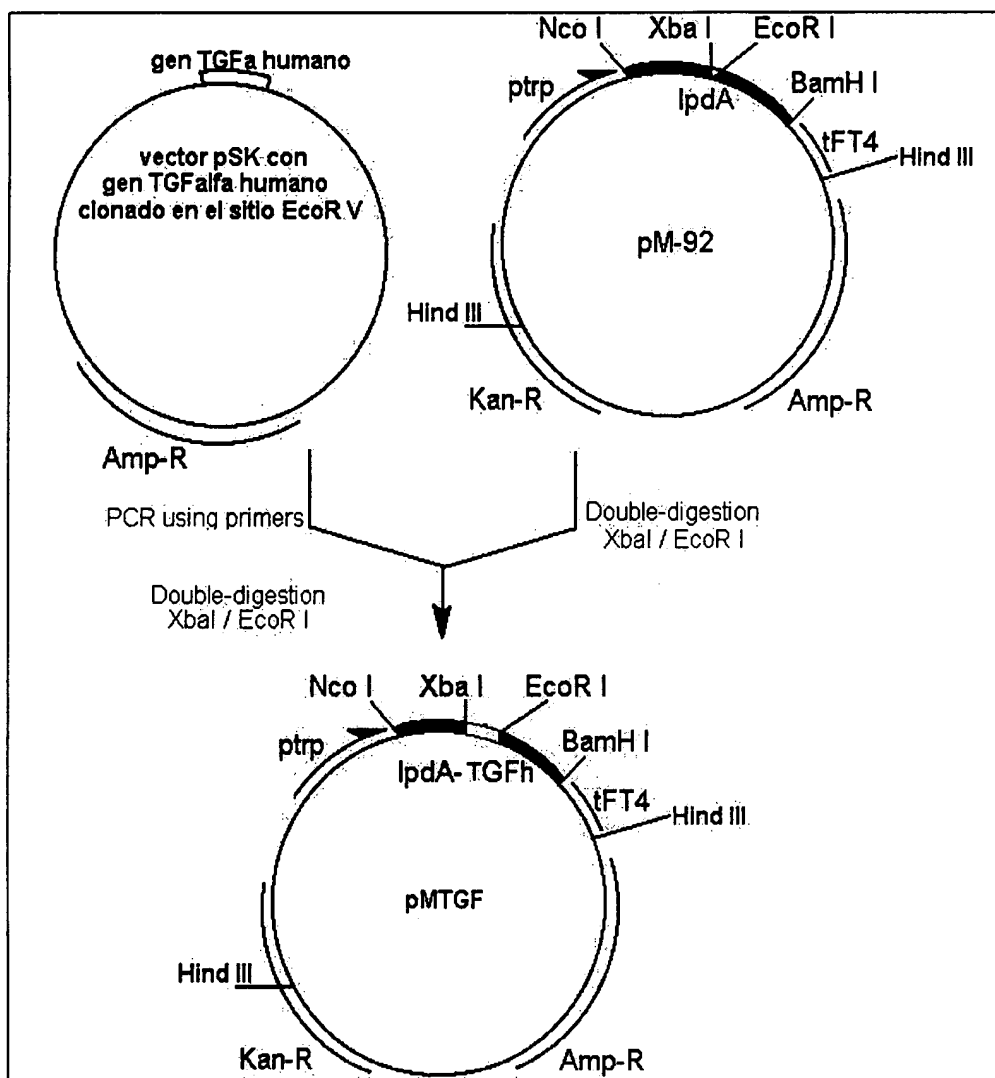



Josefa Lombardero Valladares

Representante Legal

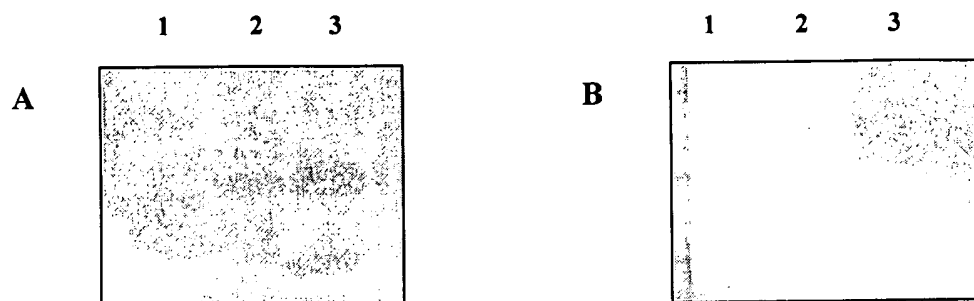
Centro de Inmunología Molecular

**Figura 2**



  
 Josefa Lombardero Valladares  
 Representante Legal  
 Centro de Inmunología Molecular

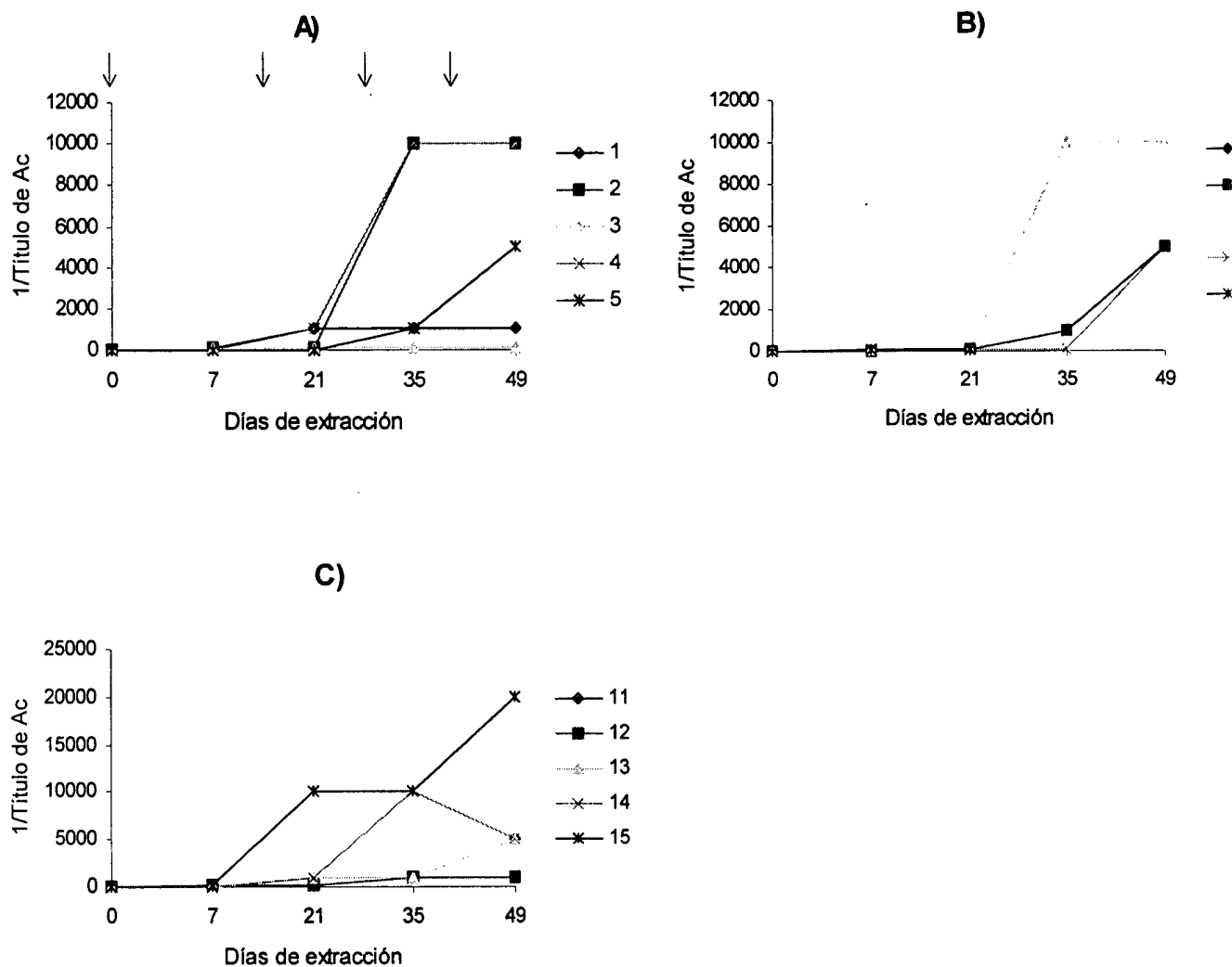
**Figura 3**



---

Josefa Lombardero Valladares  
Representante Legal  
Centro de Inmunología Molecular

**Figura 4**




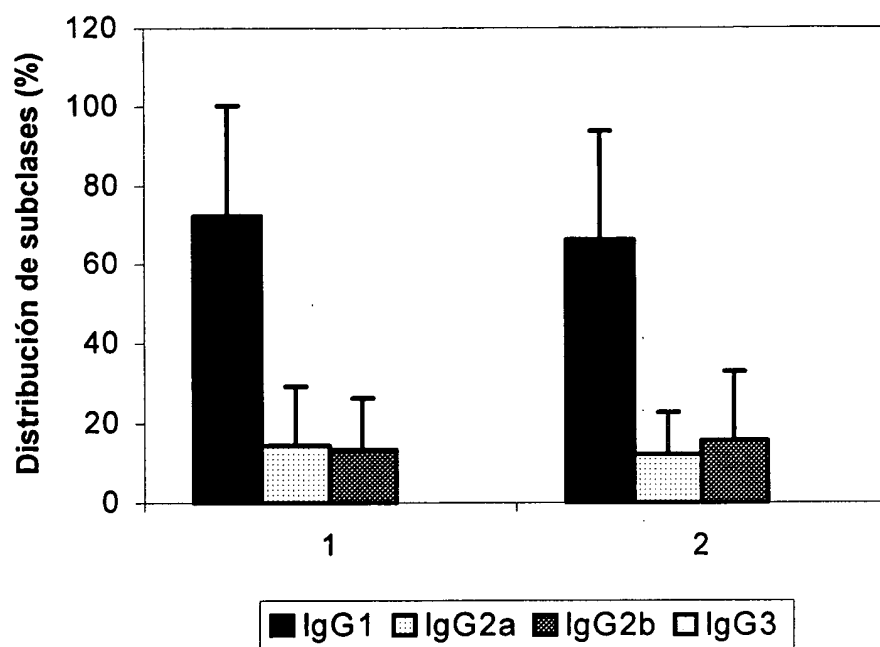

  
 Josefa Lombardero Valladares  
 Representante Legal  
 Centro de Inmunología Molecular

Figura 5



  
Josefa Lombardero Valladares  
Representante Legal  
Centro de Inmunología Molecular

**Figura 6**

<b>Ratón</b>	<b>1/Título TGF<math>\alpha</math></b>	<b>1/Título EGF</b>
<b>1</b>	<b>10000</b>	<b>5000</b>
<b>2</b>	<b>10000</b>	<b>100</b>
<b>3</b>	<b>10000</b>	<b>5000</b>
<b>4</b>	<b>10000</b>	<b>1000</b>
<b>5</b>	<b>20000</b>	<b>1000</b>
<b>6</b>	<b>10000</b>	<b>5000</b>
<b>7</b>	<b>10000</b>	<b>5000</b>
<b>8</b>	<b>10000</b>	<b>1000</b>
<b>9</b>	<b>10000</b>	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>10000</b>	<b>100</b>
<b>11</b>	<b>10000</b>	<b>100</b>
<b>12</b>	<b>10000</b>	<b>100</b>



Josefa Lombardero Valladares

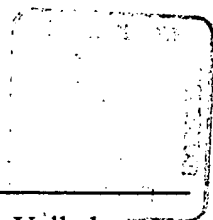
Representante Legal

Centro de Inmunología Molecular



**Figura 7**

	Pulmón	Laringe
EGF-R	+++	+++
EGF	+++	+
TGF $\alpha$	+	+++



Josefa Lombardero Valladares

Representante Legal

Centro de Inmunología Molecular

**Figura 8**

EGF



◀ 688 pb

TGF $\alpha$



◀ 621 pb

EGF-R



◀ 377 pb

GAPDH



◀ 752 pb

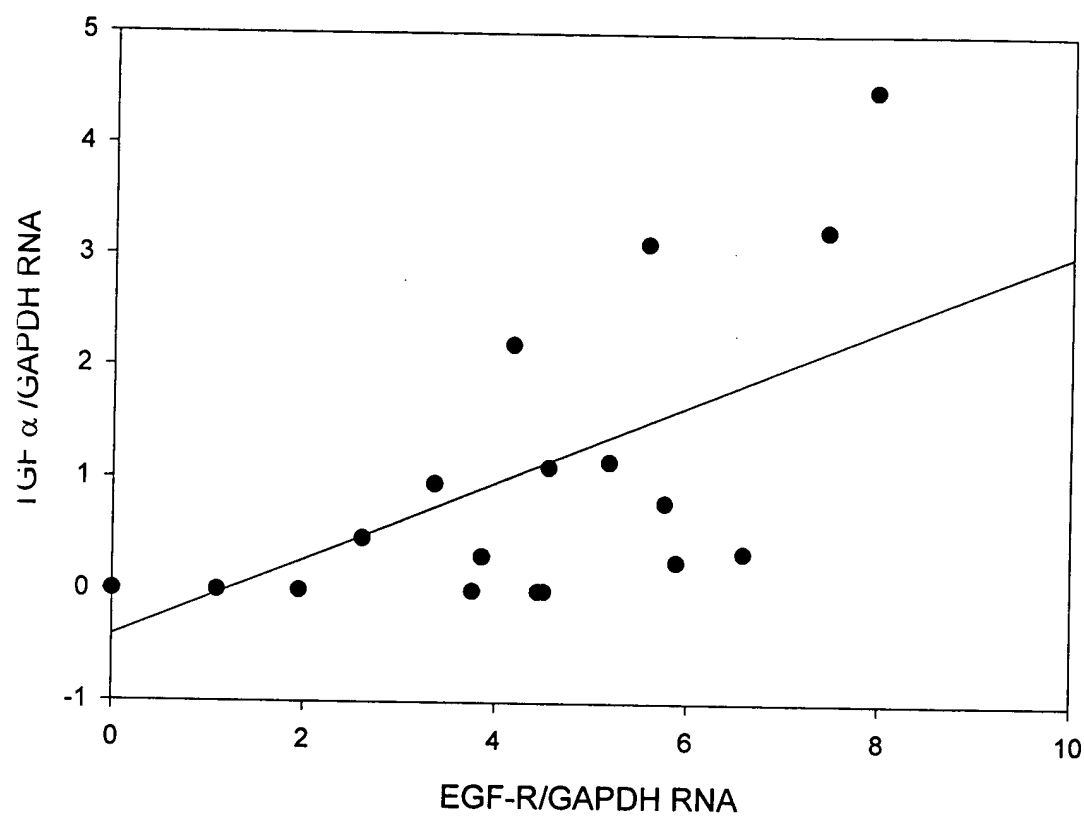
A handwritten signature in black ink, followed by a rectangular stamp. The stamp contains some text, but it is mostly illegible due to the quality of the scan.


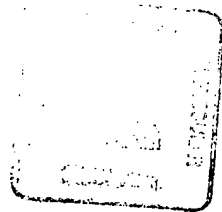
Josefa Lombardero Valladares

Representante Legal

Centro de Inmunología Molecular

**Figura 9**



Josefa Lombardero Valladares  
Representante Legal  
Centro de Inmunología Molecular